

人参皂苷 Rg1 对疲劳小鼠骨骼肌中 *TFAM* 和 *NRF-1* 基因表达的影响

孔凡秀, 杨琪, 董佳萍, 谢琳琳, 王鹤霖, 迟晓星*

(黑龙江八一农垦大学 食品学院, 黑龙江 大庆 163319)

摘要: 为了研究人参皂苷 Rg1 对疲劳模型小鼠抗疲劳作用及骨骼肌中线粒体转录因子 A(*TFAM*) 和核呼吸因子-1(*NRF-1*) 基因表达的影响, 选取 70 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为 7 组, 除空白组外, 小鼠腹腔注射环磷酰胺, 造成免疫低下模型后进行小鼠负重游泳力竭实验。ELISA 法测定小鼠肝脏及骨骼肌中疲劳相关指标的变化情况, RT-PCR 法检测小鼠骨骼肌中 *TFAM* 和 *NRF-1* 基因表达水平。结果表明, 人参皂苷 Rg1 中剂量组小鼠负重游泳的力竭时间最长, 较空白组增加了 271.4%, 且能显著增加肝糖原浓度。各剂量组小鼠肝脏 MDA 质量摩尔浓度下降, LDH 活性升高。中剂量人参皂苷 Rg1 可显著增加小鼠骨骼肌中 *TFAM* mRNA 和 *NRF-1* mRNA 表达水平。人参皂苷 Rg1 可有效调节疲劳小鼠骨骼肌中疲劳相关生化指标的水平, 具有较好的抗疲劳效果。

关键词: 人参皂苷 Rg1; 疲劳小鼠; 线粒体转录因子 A; 核呼吸因子-1

中图分类号: TS 201.4 文章编号: 1673-1689(2022)02-0067-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.02.009

Effects of Ginsenoside Rg1 on Gene Expression of *TFAM* and *NRF-1* in Skeletal Muscle of Fatigued Mice

KONG Fanxiu, YANG Qi, DONG Jiaping, XIE Linlin, WANG Helin, CHI Xiaoxing*

(College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: The anti-fatigue effect of ginsenoside Rg1 on fatigue model mice and its influence on mitochondrial transcription factor A (*TFAM*) and nuclear respiratory factor-1 (*NRF-1*) gene expression in skeletal muscle were investigated. Seventy male BALB/c mice were randomly divided into seven groups. Besides the blank group, mice were injected intraperitoneally with cyclophosphamide to create an immunodeficiency model. And then the mice were subjected to the full-load swimming exhaustion experiment. Changes in fatigue-related indexes in liver and skeletal muscle of mice were determined by ELISA. The expression levels of *TFAM* and *NRF-1* genes in the skeletal muscle of mice were detected by RT-PCR. The results showed that the duration of weight-bearing swimming was the longest in the middle dose group of ginsenoside Rg1, which increased by 271.4% compared with that of the blank group. The content of liver glycogen was significantly increased. The level of MDA in liver of mice in each dose group decreased, while the

收稿日期: 2020-11-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673170); 黑龙江省科技厅自然基金研究团队项目(TD2020C003); 黑龙江省应用技术与开发计划重大项目(GY2017YD0215)。

* 通信作者: 迟晓星(1976—), 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品营养与安全方面的研究。E-mail: chixiaoxing@sina.com

level of LDH increased. Medium dose of ginsenoside Rg1 could significantly increase the expression of *TFAM* mRNA and *NRF-1* mRNA levels in the skeletal muscles of mice. Ginsenoside Rg1 could effectively adjust the fatigue-related biochemical indicators in skeletal muscle of fatigue mice, exhibiting better anti-fatigue effect.

Keywords: ginsenoside Rg1, fatigue mice, mitochondrial transcription factor A, nuclear respiratory factor-1

人参皂苷 Rg1 是一种重要的人参皂苷单体,目前在多领域都有对人参皂苷单体的功能性研究^[1-4],但在其抗疲劳作用方面的研究相对较少^[5]。疲劳的产生伴随着能量的大量消耗,其中包括血糖与肌/肝糖原的消耗,同时伴随着疲劳产物的积累,机体调节协同机能失调等。

线粒体作为人体主要的产能场所,大量运动后机体内氧化磷酸化形成超氧化物等活性氧簇,这些活性氧簇的产生使线粒体机能衰退,导致膜活性下降,影响了线粒体电子的传递和氧化磷酸化的进行,导致 ATP 合成不足,造成机体运动能力下降,诱发运动性疲劳的发生。线粒体的功能结构与骨骼肌的功能密切相关^[6],线粒体转录因子 A(*TFAM*)为线粒体 DNA 的上游调节基因^[7-8],*TFAM* 能够与线粒体 DNA 相结合,形成一种核复合体结构,此结构能够保护线粒体 DNA (mtDNA) 免受活性氧簇的损伤。作为一种由细胞核基因编码的线粒体蛋白质,除可参与线粒体的转录、复制及形成拟核结构等生物合成方面的功能外,还可以保护线粒体免受氧化损伤。核呼吸因子-1(*NRF-1*)参与多种核编码基因和 *TFAM* 等的表达^[9]。*NRF-1* 和 *TFAM* 等组成的信号通路在线粒体生物合成中起着重要的调节作用,参与 mtDNA 的转录和复制^[10]。

作者通过强制小鼠力竭游泳造成小鼠疲劳运动模型,观察不同剂量人参皂苷 Rg1 对骨骼肌中抗氧化指标以及与线粒体生物合成密切相关的转录因子 *TFAM* 和 *NRF-1* 基因表达的调节作用,以期发现人参皂苷 Rg1 的抗疲劳作用及可能的作用途径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要试剂 人参皂苷 Rg1(纯度 98%):南京斯道夫生物科技有限公司产品;环磷酰胺:江苏盛迪医药有限公司产品;乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛

(MDA)、肝/肌糖原、蛋白质定量试剂盒:南京建成生物工程研究所产品。

1.1.2 主要仪器 5424 高速离心机:美国 Eppendorf 公司产品;紫外可见分光光度计:上海 INESA 公司产品;酶标仪:BioTec 公司产品;恒温培养箱:DRP-9162 上海森信公司产品;ABI-7300 Real-time 检测仪:ABI 公司产品。

1.2 动物与分组

雄性 BALB/c 小鼠 70 只,2 月龄,体质量 18~21 g,辽宁长生生物技术有限公司提供。小鼠按体质量随机分 7 组,每组 10 只,灌胃给药前,除空白静止和空白运动组外,其他组小鼠注射环磷酰胺制作免疫抑制模型。

人参皂苷 Rg1 用生理盐水溶解,Rg1 低(L)、中(M)、高(H)剂量组的灌胃剂量分别为 12.5、25、50 mg/kg^[11];空白静止组(BSG)、空白运动组(BEG)和模型组(MG)按体质量以等量生理盐水灌胃,阳性对照组(P)生理盐水溶解贞芪扶正颗粒,连续灌胃 21 d。小鼠在温度为(20±2)℃、相对湿度为 40%~60%、光/暗循环 12 h 环境下饲养。

1.3 小鼠免疫疲劳模型的建立

免疫低下和疲劳密不可分,免疫低下个体更易形成疲劳模型。将健康小鼠随机分组后,除 BSG 与 BEG 组腹腔注射生理盐水外,其余组腹腔注射环磷酰胺造模,根据文献[13-14]确定环磷酰胺剂量为 30 mg/kg,连续 7 d 可造成小鼠免疫低下模型。每周两次进行无负重游泳训练,如出现直立性游泳、眼鼻渗血等不能顺利完成游泳者被淘汰。各实验组小鼠置于水中互不接触,不停驱赶使之不停游泳,游泳结束后尽快擦干小鼠皮毛。训练时间为 20 min,周期为 21 d。

1.4 小鼠负重力竭游泳实验

疲劳模型建立之后,除空白静止组外,小鼠进行负重游泳试验,末次灌胃半小时后,将小鼠尾巴

根部绑紧其自身体质量 5% 的铅皮,放入水深 35 cm、水温为(25±1)℃的游泳箱中,用秒表记录时间,沉没后 10 s 仍不能浮出水面,该时间为小鼠的力竭游泳时间^[15-17]。

1.5 指标测定

1.5.1 疲劳和抗氧化生化指标测定 小鼠处死后取肝脏、骨骼肌等组织,生理盐水漂洗后滤纸吸干,按试剂盒说明测定丙二醛(TBA法)、乳酸脱氢酶(微量酶标法)、肌/肝糖原(比色法)等生化指标。

1.5.2 小鼠骨骼肌中 TFAM mRNA 和 NRF-1 mRNA 表达水平测定 取骨骼肌组织,提取总 RNA,RT-PCR 测定小鼠骨骼肌中 TFAM mRNA 和 NRF-1 mRNA 表达水平。

1) 基因序列

管家基因引物序列:

M-b-actin-F:5' GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG 3';

M-b-actin-R:5' ATGCCACAGGATTCCAT ACC 3'。

目的基因引物序列:

M-PGC-1α-F 5' GACCACAAACGATGACCCTC 3';

M-PGC-1α-R 5' TGCGACTGCGGTTGTGTAT 3';

M-NRF-1-F 5' GC AGCACCTTTGGAGAATGT 3';

M-NRF-1-R 5' CG ACCTGTGGAATACTTGAGC 3';

M-TFAM-F 5' CC CCTCGTCTATCAGTCTTGTC 3';

M-TFAM-R 5' TTC TGCTTCTGTTAGCTCCCT 3'。

2) 骨骼肌 RNA 提取和鉴定 取小鼠骨骼肌 100 mg,加 TRIZOL 提取 RNA。通过变性琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 完整性,并在紫外分光光度计测定 RNA 的质量浓度及纯度。

3) 逆转录反应 取 3 μg RNA,以 oligo(dT)为引物进行反转录,进行 cDNA 合成。20 μL 体系中含有 5× RT 缓冲液 4 μL,2.5 mmol/L dNTP 混合液 4 μL,1 μL RNA 酶抑制剂,MMLV 反转录酶 1 μL,3.5 μmol/L oligo(dT)引物 1 μL,RNA 3 pg,反应条件:37℃ 1 h,然后 95℃ 保持 5 min,冰上放置 5 min,备用。

4) 荧光定量 PCR 反应 样品按以下反应体系进行:10× PCR 缓冲液 2.5 μL,MgCl₂ 溶液 3 pL,dNTP 混合液 3 pL,Taq 聚合酶 3 U,0.25 X Syber-green,上游引物 F(20 pmol/L) 0.5 pL,下游引物 R (20 μmol/L) 0.5 pL,cDNA 1 μL,加 ddH₂O 至总体积为 25 μL。反应条件为:95℃ 反应 20 s,60℃ 反应

20 s,72℃ 反应 20 s,87℃ 反应 10 s,共 40 个循环。反应结束后,电脑自动分析荧光信号并将其转换为 C_t 值。结合 RNA 浓度,将荧光定量 PCR 定量结果进行换算,得出待测样本的 RNA 表达量。

5) PCR 产物定量分析的校正 采用 Beta-actin 作为内参照。将 TFAM、NRF-1 和内参基因 C_t 值之间的差值来计算基因表达差异。

1.6 数据处理

数据采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析,采用 LSD 法进行多重比较,数据均以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以组间方差分析 P<0.05 为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 小鼠负重游泳的力竭时间

从表 1 可以看出,与空白组相比,各剂量组小鼠负重游泳的力竭时间均有不同程度的延长,尤以中剂量组效果最为明显。与空白组和模型组相比,中剂量(25 mg/kg)的人参皂苷 Rg1 可显著延长小鼠的力竭游泳时间,增长率为 271.4%,差异有显著性(P<0.01)。

表 1 小鼠负重游泳力竭时间

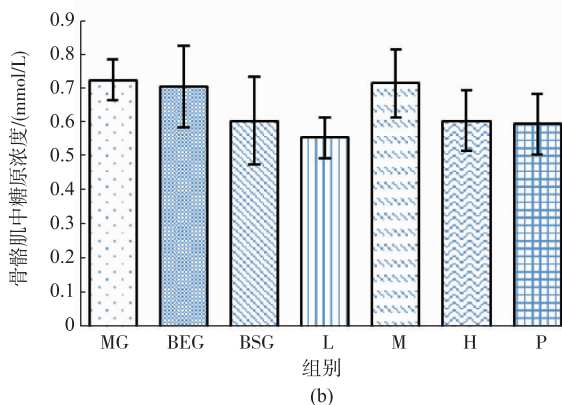
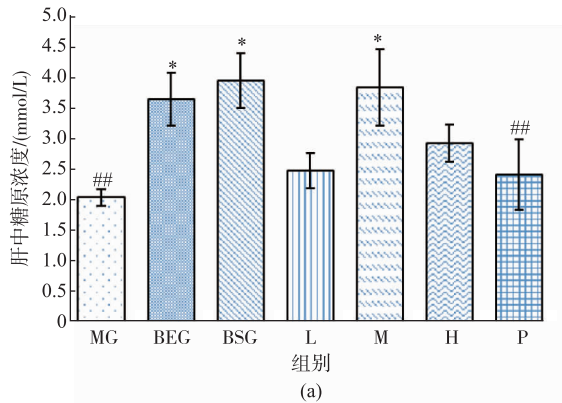
Table 1 Exhausted time of mice swimming with load

| 组别 | n | 游泳时间/s | 增长率/% |
|------------|----|-------------------------------|-------|
| BEG(空白运动组) | 10 | 454.0±76.2 | — |
| MG(模型组) | 10 | 571.0±216.1 | 25.8 |
| L(低剂量组) | 10 | 587.5±199.6 | 29.4 |
| M(中剂量组) | 10 | 1 686.0±380.4 ^{###*} | 271.4 |
| H(高剂量组) | 10 | 502.3±104.5 | 10.6 |
| P(阳性对照组) | 10 | 573.6±205.2 | 26.3 |

注:#与空白运动组比较,P<0.05;##与空白运动组比较,P<0.01;*与模型组比较,P<0.05;**与模型组比较,P<0.01。BEG 组为空白运动组,即灌胃生理盐水的空白对照组;MG 组为模型组,即免疫低下模型后生理盐水灌胃。

2.2 小鼠肝脏和骨骼肌中糖原水平

如图 1 所示,各组间肌糖原浓度无显著差异性。与模型组比较,中剂量人参皂苷 Rg1 组可明显增加小鼠肝糖原浓度(P<0.05),说明在中剂量时人参皂苷 Rg1 增加疲劳小鼠肝糖原的效果较好。

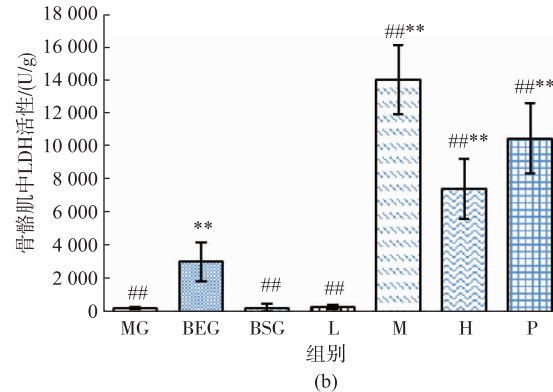
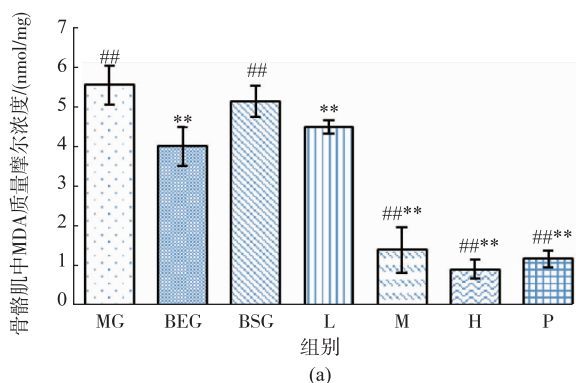


#: 与 BEG 组比较, $P < 0.05$; ##: 与 BEG 组比较, $P < 0.01$; *: 与 MG 组比较, $P < 0.05$; **: 与 MG 组比较, $P < 0.01$ 。

图 1 人参皂苷 Rg1 对小鼠肝糖原和肌糖原浓度的影响
Fig. 1 Effects of ginsenoside Rg1 on glycogen levels of liver and skeletal muscle of mice

2.3 小鼠骨骼肌中 MDA、LDH 的水平

如图 2 所示,与 MG 组比较,人参皂苷 Rg1 各剂量组小鼠骨骼肌中 MDA 质量摩尔浓度均明显下降,差异具有显著性($P < 0.01$)。与空白静止组相比,模型组、空白运动组和低剂量组骨骼肌中 LDH 活性下降明显($P < 0.01$);与模型组和空白组相比,中、高剂量组小鼠骨骼肌中 LDH 活性增加显著($P < 0.01$)。



#: 与 BEG 组比较, $P < 0.05$; ##: 与 BEG 组比较, $P < 0.01$; *: 与 MG 组比较, $P < 0.05$; **: 与 MG 组比较, $P < 0.01$ 。

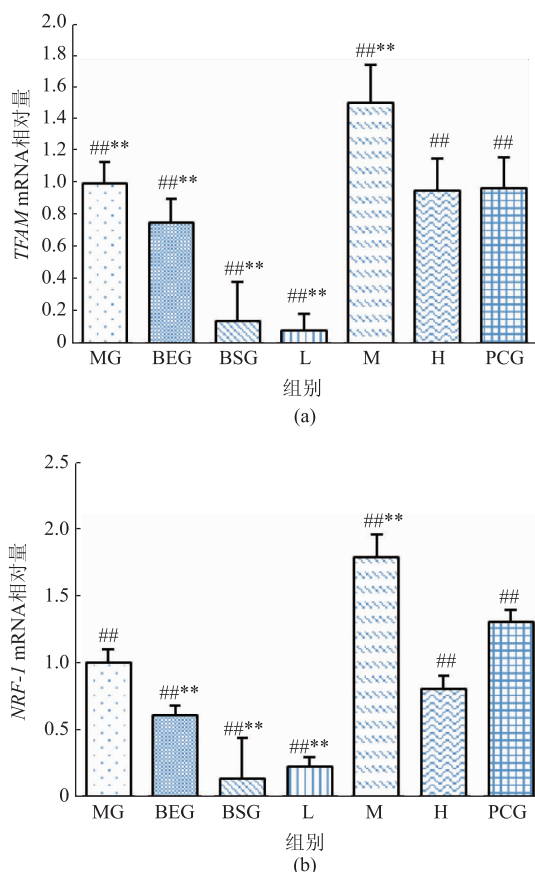
图 2 人参皂苷 Rg1 对小鼠骨骼肌中 MDA 和 LDH 的影响
Fig. 2 Effects of ginsenoside Rg1 on MDA and LDH content in skeletal muscle of mice

2.4 小鼠骨骼肌中 *TFAM* 和 *NRF-1* 基因表达水平

从图 3 可以看出,与模型组相比,中剂量人参皂苷 Rg1 可显著增加小鼠骨骼肌中 *TFAM* mRNA 和 *NRF-1* mRNA 表达水平,说明人参皂苷 Rg1 在 25 mg/kg 的剂量下,对骨骼肌中线粒体相关因子的调节作用最好,从而提高线粒体的生物合成,使线粒体氧化供能增强。

3 结语

目前已有研究发现,人参皂苷 Rg1 主要是通过加速自由基清除率、增强体内抗氧化酶活性、维持血糖水平、促进糖原合成等方面共同协作发挥抗疲劳作用。疲劳的产生通常伴随着能量的大量消耗,其中包括血糖与肌/肝糖原的消耗,同时伴随着疲劳产物的积累,机体调节协同机能失调等^[8]。本研究结果显示,中剂量的人参皂苷 Rg1 显著增加了小鼠肝糖原浓度,可有效减少能量消耗。有学者通过实验证实,小鼠灌胃人参提取物后可延长力竭负重游泳时间,具有抗疲劳作用。宋娟和刘涛^[9]研究发现,人参皂苷 Rg1 可明显降低慢性疲劳综合征大鼠脂质过氧化物丙二醛的含量,同时增强抗氧化酶 SOD 的活性,说明人参皂苷 Rg1 能够提高抗氧化酶系统活性并减轻脂质过氧化代谢产物的堆积,具有良好的抗疲劳作用。王莹等研究表明,人参皂苷 Rg1 能显著延长小鼠力竭游泳时间,降低血清中尿素氮水平,同时维持血糖水平,增加肌糖原和肝糖原储备,显著降低小鼠运动后血乳酸浓度,以上研



#: 与 BEG 组比较, $P < 0.05$; ##: 与 BEG 组比较, $P < 0.01$; *: 与 MG 组比较, $P < 0.05$; **: 与 MG 组比较, $P < 0.01$ 。

图 3 小鼠骨骼肌中 *TFAM* mRNA 和 *NRF-1* mRNA 表达水平

Fig. 3 Expression of *TFAM* mRNA and *NRF-1* mRNA in skeletal muscle of mice

究结果与本实验结果基本一致。在本实验中,小鼠游泳运动后与正常运动组小鼠比较,肝和骨骼肌中 MDA 质量摩尔浓度并无显著性差异。在给予人参皂

苷后,各剂量组的人参皂苷对骨骼肌组织中的 MDA 质量摩尔浓度均有降低作用。

TFAM 基因的启动子上具有多种调节因子的识别位点,其中 *NRF-1* 占主导位置,二者与 DNA 结合后可增高其 mRNA 的表达及升高 *TFAM* 的蛋白质合成,从而增加线粒体进行生物合成^[9]。*NRF-1* 的主要作用是调控 mtDNA 的表达,包括线粒体转录因子 A (*TFAM*),其中 *TFAM* 在调控 mtDNA 表达及线粒体基因组复制中起重要作用。*TFAM* 是 mtDNA 复制转录的直接调控子^[21],学者通过敲除了 *TFAM* 基因的大鼠发现,mtDNA 的复制明显减少,并且线粒体电子传递能力受到损伤^[22]。线粒体功能的改善可能与 *TFAM* 的大量表达相关联,其作用还有参与调节线粒体的转录机制^[20]。*NRF-1* 能调控多种线粒体蛋白质的表达^[12]。*TFAM* 可在 *NRF-1* 的作用调节下激活,对 mtDNA 的复制与转录起着重要的调控作用。赵婷婷等研究证实,一次长时间大鼠游泳后能促进骨骼肌中 PGC-1 α 与 *TFAM* mRNA 的共同表达,黄芪丹参复合物可通过 p38MAPK-PGC-1 α -*NRF-1*-*TFAM* 途径促进线粒体生物发生。实验结果显示:不同剂量的人参皂苷 Rg1 可同时上调 *NRF-1* 和 *TFAM* 基因的表达,以中剂量组 (25 mg/kg) 效果最明显,说明人参皂苷 Rg1 可激活 *NRF-1* 在线粒体转录因子 A (*TFAM*) 启动子上的转录功能,而 *TFAM* 是线粒体生物合成的直接调控因子,因此证明人参皂苷 Rg1 可改善线粒体功能和修复肌细胞的损伤,对骨骼肌肌细胞产生保护作用。

人参皂苷 Rg1 对疲劳模型小鼠的疲劳相关指标肝/肌糖原以及骨骼肌中抗氧化指标有很好的调节作用,并能有效调节骨骼肌中线粒体合成过程中的重要因子的表达水平,从而起到抗疲劳的作用。

参考文献:

- [1] AZIKE C, CHARPENTIER P, HOU J, et al. The Yin and Yang actions of North American ginseng root in modulating the immune function of macrophages[J]. *Chinese Medicine*, 2011, 6(1): 21-22.
- [2] SABA Evelyn, LEE Yuan Yee, KIM Minki, et al. A comparative study on immune-stimulatory and antioxidant activities of various types of ginseng extracts in murine and rodent models[J]. *Journal of Ginseng Research*, 2018, 42(4): 577-584.
- [3] 马赫佟, 郜玉钢, 祝洪艳, 等. 人参皂苷 Rg2、Rh1 对神经系统作用及相关机制的研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2018, 52(12): 110-112.
- [4] 苏惠, 李树德, 尹凤琼, 等. 人参皂苷 Rg1 缓解糖尿病并发症的研究进展[J]. *云南中医中药杂志*, 2020, 41(5): 89-93.
- [5] 王学芳, 任红贤, 封颖璐. 人参皂苷单体的抗疲劳作用研究进展[J]. *解放军医药杂志*, 2019, 31(12): 114-116.

- [6] HOOD D A, IRRCHER I, LJUBICIC V, et al. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle[J]. **Experimental Biology**, 2006, 209(12): 2265-2275.
- [7] 何诗依, 张纓. 运动、线粒体转录因子 A 与骨骼肌萎缩[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(8): 837-842.
- [8] 宋银娟, 廖轶, 赵德明, 等. 线粒体转录因子 A 的调节和功能[J]. 动物医学进展, 2017, 38(11): 112-116.
- [9] MAO S, LEONE T C, KELLY D P, et al. Mitochondrial transcription factor A is increased but expression of ATP synthase beta subunit and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene are decreased in hearts of copper-deficient rats[J]. **The Journal of Nutrition**, 2000, 130(9): 2143-2150.
- [10] KELLY D P, SCARPULLA R C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function [J]. **Genes & Development**, 2004, 18(4): 357-368.
- [11] 贺洪, 唐晖, 汪保和, 等. 人参皂苷 Rg1 对小鼠力竭游泳后恢复期骨骼肌自由基代谢的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2002, 21(6): 610-612.
- [12] MASKI I, HIDENORI M, DONGCHON K, et al. Overexpression of mitochondrial transcription factor a ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction[J]. **Circulation**, 2005, 112(5): 683-690.
- [13] 李璐, 黄宏业, 韦现色, 等. 不同剂量环磷酰胺对小鼠免疫功能抑制作用的研究[J]. 畜牧与饲料学, 2016, 37(9): 1-3.
- [14] 高敏, 侯衍豹, 杨勇, 等. 不同条件环磷酰胺建立小鼠免疫力低下模型的比较及偏最小二乘法 (PLS) 数学建模分析[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(9): 62-69.
- [15] 龚频, 王双, 杜超, 等. 两种魔芋多糖抗疲劳及降血糖活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(7): 259-262.
- [16] 杨晓, 王畋, 刘畅, 等. 大豆肽与牛磺酸复合粉的抗疲劳作用[J]. 食品与机械, 2018, 34(1): 140-143.
- [17] 周丹英, 徐佳媛, 余琪, 等. 黄秋葵胶囊对小鼠抗疲劳作用及机制研究[J]. 食品科技, 2017, 42(5): 52-54.
- [18] 代朋乙, 黄昌林. 运动性疲劳研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2016, 41(11): 955-964.
- [19] 宋娟, 刘涛. 人参皂苷 Rg1 对慢性疲劳综合征大鼠抗氧化酶系统活性的影响研究[J]. 陕西中医, 2014, 35(1): 101-103.
- [20] GOLDENTHAL M J. Mitochondrial involvement in myocyte death and heart failure[J]. **Heart Failure Reviews**, 2016, 21(2): 137-155.
- [21] CAMPBELL C T, KOLESAR J E, KAUFMAN B A. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2012, 1819(9-10): 921-929.
- [22] FATIHA, NASSIR, JAMAL, et al. Role of mitochondria in alcoholic liver disease[J]. **World Journal of Gastroenterology**, 2014, 20(9): 2136.